

IN THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant(s): ENDO, Keiji et al

Application No.:

Group:

Filed: June 9, 2000

Examiner:

For: MUTANT ALPHA-AMYLASES

RECEIVED

FEB 01 2001

RECEIVED  
FEB 01 2001  
16042300

Jc029 U.S. PRO

09/590375

06/09/00

L E T T E R

Assistant Commissioner for Patents  
Box Patent Application  
Washington, D.C. 20231

June 9, 2000  
2173-0120P

#5  
2/9/01

Sir:

Under the provisions of 35 USC 119 and 37 CFR 1.55(a), the applicant hereby claims the right of priority based on the following application(s):

<u>Country</u>	<u>Application No.</u>	<u>Filed</u>
JAPAN	11-163569	06/10/99

A certified copy of the above-noted application(s) is(are) attached hereto.

If necessary, the Commissioner is hereby authorized in this, concurrent, and future replies, to charge payment or credit any overpayment to deposit Account No. 02-2448 for any additional fees required under 37 C.F.R. 1.16 or under 37 C.F.R. 1.17; particularly, extension of time fees.

Respectfully submitted,

BIRCH, STEWART, KOLASCH & BIRCH, LLP

By: 

JOHN W. BAILEY

Reg. No. 32,881

P. O. Box 747

Falls Church, Virginia 22040-0747

Attachment  
(703) 205-8000  
/dpt

ENDO, Keiji et al  
June 9, 2000  
Biech, Stewart, Kolasch & Biech  
703-205-8000  
2173-0120P 10/1

FP-KS-0555  
US

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1999年 6月10日

出 願 番 号

Application Number:

平成11年特許願第163569号

出 願 人

Applicant (s):

花王株式会社

06/09/00  
09/590375  
JCS29 U.S. PTO



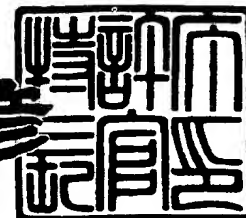
RECEIVED  
FEB -5 2001  
TC 1703 MAIL ROOM

RECEIVED  
FEB 07 2001  
TECH CENTER 10042300

2000年 4月 7日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

近 藤 隆 彦



出証番号 出証特2000-3023988

【書類名】 特許願

【整理番号】 P02341106

【提出日】 平成11年 6月10日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 9/28  
C12N 15/09

【発明者】

【住所又は居所】 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所  
内

【氏名】 遠藤 圭二

【発明者】

【住所又は居所】 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所  
内

【氏名】 五十嵐 一暁

【発明者】

【住所又は居所】 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所  
内

【氏名】 林 康弘

【発明者】

【住所又は居所】 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所  
内

【氏名】 萩原 浩

【発明者】

【住所又は居所】 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所  
内

【氏名】 尾崎 克也

【特許出願人】

【識別番号】 000000918

【氏名又は名称】 花王株式会社

【代理人】

【識別番号】 100068700

【弁理士】

【氏名又は名称】 有賀 三幸

【選任した代理人】

【識別番号】 100077562

【弁理士】

【氏名又は名称】 高野 登志雄

【選任した代理人】

【識別番号】 100096736

【弁理士】

【氏名又は名称】 中嶋 俊夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100101317

【弁理士】

【氏名又は名称】 的場 ひろみ

【選任した代理人】

【識別番号】 100106909

【弁理士】

【氏名又は名称】 棚井 澄雄

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 011752

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 変異 $\alpha$ -アミラーゼ

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列に対して70%以上の相同性を有する $\alpha$ -アミラーゼにおいて、該アミノ酸配列の11番目のTyr、16番目のGlu、49番目のAsn、84番目のGlu、144番目のSer、167番目のGln、169番目のTyr、178番目のAla、188番目のGlu、190番目のAsn、205番目のHis及び209番目のGlnのうちのいずれかに相当するアミノ酸残基の1残基以上を置換又は欠失させてなる変異 $\alpha$ -アミラーゼ。

【請求項2】 配列番号1に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列に対して70%以上の相同性を有する $\alpha$ -アミラーゼにおいて、該アミノ酸配列のアミノ末端から11~100アミノ酸残基に相当する配列を他の液化型 $\alpha$ -アミラーゼの該アミノ酸配列に相当するアミノ酸配列に置換させてなる変異 $\alpha$ -アミラーゼ。

【請求項3】 配列番号1のアミノ酸配列の1番目のAspから19番目のGlyまでに相当する配列を他の液化型 $\alpha$ -アミラーゼの該アミノ酸配列に相当するアミノ酸配列に置換させたものである請求項2記載の変異 $\alpha$ -アミラーゼ。

【請求項4】 他の液化型 $\alpha$ -アミラーゼが配列番号2に示されるアミノ酸配列を有するものである請求項2又は3記載の変異 $\alpha$ -アミラーゼ。

【請求項5】 配列番号1に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列に対して70%以上の相同性を有する $\alpha$ -アミラーゼに対して、請求項1記載のアミノ酸残基の置換又は欠失及び請求項2~4のいずれかに記載のアミノ酸配列の置換から選ばれる2種以上の置換又は欠失を組み合わせて変異させた変異 $\alpha$ -アミラーゼ。

【請求項6】 アミノ酸残基の置換が配列番号1のアミノ酸配列の49番目のAsnに相当するアミノ酸残基をSer、167番目のGlnに相当するアミノ酸残基をGlu、169番目のTyrに相当するアミノ酸残基をLys、190番目のAsnに相当するアミノ酸残基をPhe、205番目のHisに相当す

るアミノ酸残基をA r g又は209番目のG l nに相当するアミノ酸残基をV a lに置換させてなるものであり、アミノ酸配列の置換が配列番号1の1番目のA s pから19番目のG l yまでのアミノ酸配列を配列番号2の1番目のH i sから21番目のG l yまでのアミノ酸配列に置換させてなるものである請求項5記載の変異 $\alpha$ -アミラーゼ。

【請求項7】 請求項1～6のいずれか1項記載の変異 $\alpha$ -アミラーゼをコードする遺伝子又は当該遺伝子を含むベクター。

【請求項8】 請求項7に記載のベクターで形質転換された細胞。

【請求項9】 請求項8に記載の形質転換細胞を培養することを特徴とする変異 $\alpha$ -アミラーゼの製造方法。

【請求項10】 請求項1～6のいずれか1項記載の変異 $\alpha$ -アミラーゼを含む洗浄剤組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、優れた耐熱性を有し、特に洗剤用酵素として有用な変異液化型アルカリ $\alpha$ -アミラーゼ及びその遺伝子に関する。

【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】

従来、 $\alpha$ -アミラーゼ [EC.3.2.1.1]を洗剤用として利用する場合には、澱粉を高ランダムに分解でき、アルカリ性で安定で且つキレート成分、酸化漂白成分に対しても安定である液化型アルカリ $\alpha$ -アミラーゼが好ましいとされている。しかしながら、液化型アミラーゼは一般に、酵素の構造維持にカルシウムイオンが重要であり、キレート剤の存在下ではその安定性が低下し、また作用至適pHに関しても中性ないし弱酸性領域であるものが殆どであった。

斯かる状況の下、本発明者らは、土壌中から分離した好アルカリ性*Bacillus* s p KSM-K38 (FERM P-16817) 株及び同KSM-K36 (FERM P-16816) 株の生産する酵素が、従来の液化型 $\alpha$ -アミラーゼでは失活が認められる高い濃度のキレート剤によって全く活性の低下を示さず、更に界面活性剤や酸化剤に対する耐性を有し

ていること、また、従来の液化型 $\alpha$ -アミラーゼに比べて、アルカリ側で高い活性を有し洗剤用として有用であることを見出している(特願平 1 0 - 3 6 2 4 8 7 号)。

## 【0 0 0 3】

しかし、当該酵素は 5 0℃以上の温度では失活を示すことから、衣料や食器の洗浄が 1 0～6 0℃付近で行うのが一般的あることを考えるとその耐熱性がやや不十分であった。

本発明は、アルカリ側で高い活性を有し、キレート成分、酸化漂白成分に対しても安定である液化型アルカリ $\alpha$ -アミラーゼであって、且つ優れた耐熱性を有する $\alpha$ -アミラーゼを提供することを目的とする。

## 【0 0 0 4】

## 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、液化型アルカリ $\alpha$ -アミラーゼについて種々の変異酵素を取得、検討した結果、K S M - K 3 8 由来アミラーゼのアミノ酸配列(配列番号 1)の特定のアミノ酸残基に変異を与えることにより、キレート剤耐性や酸化剤耐性の特性及びアルカリ領域に於ける高い比活性を失うことなく耐熱性が向上すること、またこれらの変異を組み合わせることによって更なる耐熱化が可能であることを見出し、本発明を完成した。

## 【0 0 0 5】

即ち、本発明は、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列に対して 7 0 % 以上の相同性を有する $\alpha$ -アミラーゼにおいて、該アミノ酸配列の 1 1 番目の T y r、1 6 番目の G l u、4 9 番目の A s n、8 4 番目の G l u、1 4 4 番目の S e r、1 6 7 番目の G l n、1 6 9 番目の T y r、1 7 8 番目の A l a、1 8 8 番目の G l u、1 9 0 番目の A s n、2 0 5 番目の H i s 及び 2 0 9 番目の G l n のうちのいずれかに相当するアミノ酸残基の 1 残基以上を置換又は欠失させてなる変異 $\alpha$ -アミラーゼを提供するものである。

## 【0 0 0 6】

また本発明は、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列に対して 7 0 % 以上の相同性を有する $\alpha$ -アミラーゼにおいて、該アミノ酸配列のアミ

ノ末端から 11～100 アミノ酸残基に相当する配列を他の液化型  $\alpha$ -アミラーゼの該アミノ酸配列に相当するアミノ酸配列に置換させてなる変異  $\alpha$ -アミラーゼを提供するものである。

【0007】

また本発明は、この変異  $\alpha$ -アミラーゼをコードする遺伝子、該遺伝子を有するベクター、該ベクターで形質転換された細胞、該形質転換細胞を培養すること、を特徴とする変異  $\alpha$ -アミラーゼの製造方法を提供するものである。

【0008】

更に本発明は、この変異  $\alpha$ -アミラーゼを含有する洗浄剤組成物を提供するものである。

【0009】

【発明の実施の形態】

本発明の変異  $\alpha$ -アミラーゼは、配列番号 1 に示したアミノ酸配列又は該配列と 70% 以上の相同性を有するアミノ酸配列を有する液化型アルカリ  $\alpha$ -アミラーゼをコードする遺伝子を変異させて得られるものであるが、アミノ酸の欠失・置換により耐熱性を向上させた例は従来の液化型  $\alpha$ -アミラーゼについても行われていた。例えば、B. amyloliquefaciens 由来の酵素において 177 番目の A r g から 188 番目の G l y 残基を欠失させたもの (J. Biol. Chem., 264, 18933, 1989)、B. licheniformis の酵素において、133 番目の H i s を T y r に置換したもの (J. Biol. Chem., 265, 15481, 1990) が報告されている。しかし、本発明で用いられる液化型アルカリ  $\alpha$ -アミラーゼは、従来の液化型  $\alpha$ -アミラーゼとのアミノ酸相同性は低く、また上記の 177 番目の A r g から 188 番目の G l y 残基に相当する部位は既に欠失しており、また、133 番目の H i s 相当のアミノ酸は既に T y r であり、従来酵素の例が必ずしも適用できるものではない。即ち、本発明における耐熱性を向上させるためのアミノ酸配列の変異はこれまでの例とは全く異なるものである。

【0010】

当該液化型アルカリ  $\alpha$ -アミラーゼの例としては、本発明者らが土壌中から分離した Bacillus sp. KSM-K38 (FERM P-16817) 株由来であり、配列番号 1 のアミ



ノ酸配列を有する酵素（特願平10-362487号）、或いは同KSM-K36(FERM P-16816)株由来であって配列番号1のアミノ酸配列と約95%の相同性を有する酵素（配列番号4）（特願平10-362487号）等が挙げられる。尚、アミノ酸配列の相同性はLipman-Pearson法（Science, 227, 1435, 1985）によって計算される。

#### 【0011】

本発明の変異 $\alpha$ -アミラーゼの取得は、先ず液化型 $\alpha$ -アミラーゼを生産する微生物より、当該液化型 $\alpha$ -アミラーゼをコードする遺伝子をクローニングするが、その方法は、一般的な遺伝子組換え技術を用いれば良く、例えば、特開平8-336392号記載の方法を用いることができる。遺伝子の例としては、配列番号3及び配列番号5に示されるものが挙げられる。

#### 【0012】

次に得られた遺伝子に対して変異を与えるが、その方法としても一般的に行われている部位特異的変異の方法であればいずれも採用でき、例えば宝酒造社のSite-Directed Mutagenesis System Mutan-Super Express Kmキット等を用いて行うことができる。また、リコンビナントPCR (polymerase chain reaction) 法 (PCR protocols, Academic press, New York, 1990)を用いることによって、遺伝子の任意の配列を他の遺伝子の該任意の配列に相当する配列と置換することが可能である。

#### 【0013】

本発明における耐熱化変異は、配列番号1に示されるアミノ酸配列の11番目のTyrに相当するアミノ酸残基をPhe、16番目のGluに相当するアミノ酸残基をPro、49番目のAsnに相当するアミノ酸残基をSer、84番目のGluに相当するアミノ酸残基をGln、144番目のSerに相当するアミノ酸残基をPro、167番目のGlnに相当するアミノ酸残基をGlu、169番目のTyrに相当するアミノ酸残基をLys、178番目のAlaに相当するアミノ酸残基をGln、188番目のGluに相当するアミノ酸残基をAsp、190番目のAsnに相当するアミノ酸残基をPhe、205番目のHisに相当するアミノ酸残基をArg又は209番目のGlnに相当するアミノ酸残基

を V a l に置換する変異が望ましい。

【0014】

また、本発明の配列番号 1 のアミノ酸配列のアミノ末端 (A s p) から 11 ~ 100 アミノ酸残基に相当するアミノ酸配列、好ましくは、1 番目の A s p から 19 番目の G l y に相当する配列を、他の液化型  $\alpha$ -アミラーゼの該アミノ酸配列に相当するアミノ酸配列に置換することによっても耐熱化を達成することができる。

【0015】

置き換える他の液化型  $\alpha$ -アミラーゼの例としては、例えば配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を有する酵素が挙げられ、その配列の前記 1 番目の A s p から 19 番目の G l y に相当する部位は 1 番目の H i s から 21 番目の G l y である。当該酵素は、Bacillus sp. KSM-AP1378 (FERM BP-3048) 株由来の液化型  $\alpha$ -アミラーゼであり、その遺伝子配列は特開平 8-336392 号において開示されている。

【0016】

本発明の変異  $\alpha$ -アミラーゼにおいては、更に上記の各種アミノ酸残基の置換又は欠失及びアミノ酸配列の置換から選ばれる 2 種以上の置換又は欠失を組み合わせた変位も有効であり、組み合わせることにより、より耐熱性が向上した変異酵素を得ることができる。即ち、変異の組み合わせ方は、各種アミノ酸残基の置換又は欠失の 2 種以上を組み合わせたもの、アミノ酸配列の置換を 2 種以上組み合わせたもの及びアミノ酸残基の置換又は欠失とアミノ酸配列の置換を 2 種以上組み合わせたものが挙げられるが、好ましくは 49 番目の A s n に相当するアミノ酸残基を S e r、167 番目の G l n に相当するアミノ酸残基を G l u、169 番目の T y r に相当するアミノ酸残基を L y s、190 番目の A s n に相当するアミノ酸残基を P h e、205 番目の H i s に相当するアミノ酸残基を A r g 若しくは 209 番目の G l n に相当するアミノ酸残基を V a l に置換する変異、又は 1 番目の A s p から 19 番目の G l y までに相当する配列を配列番号 2 に示されるアミノ酸配列の 1 番目の H i s から 21 番目の G l y までのアミノ酸配列に置換する変異のうちいずれか 2 種以上の変異を適宜組み合わせるとよい。

更に、最適な組み合わせの例としては、49番目のA s nに相当するアミノ酸残基をS e r、167番目のG l nに相当するアミノ酸残基をG l u、169番目のT y rに相当するアミノ酸残基をL y s、190番目のA s nに相当するアミノ酸残基をP h e、205番目のH i sに相当するアミノ酸残基をA r g及び209番目のG l nに相当するアミノ酸残基をV a lに置換する変異の組み合わせ、或いは1番目のA s pから19番目のG l yまでに相当する配列を配列番号2に示されるアミノ酸配列の1番目のH i sから21番目のG l yまでのアミノ酸配列に置換する変異と、167番目のG l nに相当するアミノ酸残基をG l u、169番目のT y rに相当するアミノ酸残基をL y s、190番目のA s nに相当するアミノ酸残基をP h e、209番目のG l nに相当するアミノ酸残基をV a lに置換する変異の組み合わせ等が挙げられる。

## 【0017】

また、上記の変異に、耐熱性以外の特性を改良する変異、例えば、組換え枯草菌による酵素生産性を向上させる128番目のA s pに相当するアミノ酸残基をV a lに置換する変異や酸化剤耐性をより強化する107番目のM e tに相当するアミノ酸残基をL e uに置換する変異、更に衣料用洗剤における洗浄力を増強させる188番目のG l uに相当するアミノ酸残基をI l eに置換する変異等を組み合わせることも可能である。

## 【0018】

かくして得られる本発明変異 $\alpha$ -アミラーゼは、高いキレート剤耐性の優れた特性及びアルカリ領域に於ける高い比活性を失うことなく、熱に対する安定性が向上することから、自動食器洗浄機用洗浄剤、衣料用洗浄剤、繊維糊抜き剤として有用である。

## 【0019】

当該洗浄剤には、上記変異 $\alpha$ -アミラーゼ以外に、更に枝切り酵素（例えばブルナーゼ、イソアミラーゼ、ネオブルナーゼなど）、 $\alpha$ -グルコシダーゼ、グルコアミラーゼ、プロテアーゼ、セルラーゼ、リパーゼ、ペクチナーゼ、プロトペクチナーゼ、ペクチン酸リアーゼ、パーオキシダーゼ、ラッカーゼ及びカタラーゼから選ばれる1種または2種以上の酵素を配合することができる。

## 【0020】

また、洗浄剤に通常配合されるアニオン界面活性剤、両性界面活性剤、ノニオン界面活性剤、カチオン界面活性剤等の界面活性剤、キレート剤、アルカリ剤、無機塩、再汚染防止剤、塩素捕捉剤、還元剤、漂白剤、蛍光染料可溶化剤、香料、ケーキング防止剤、酵素の活性化剤、酸化防止剤、防腐剤、色素、青味付け剤、漂白活性化剤、酵素安定化剤、調節剤等を配合することができる。

## 【0021】

本発明の洗浄剤組成物は、上記変異 $\alpha$ -アミラーゼ及び上記公知の洗浄成分を組み合わせて常法に従い、製造することができる。洗浄剤の形態は、用途に応じて選択することができ、例えば、液体、粉末、顆粒等に行うことができる。また、本発明洗浄剤組成物は、衣料用洗浄剤、漂白洗浄剤、自動食器洗浄機用洗浄剤、配水管洗浄剤、義歯洗浄剤等として使用できるが、特に衣料用洗浄剤、漂白洗浄剤、自動食器洗浄機用洗浄剤として好適に使用することができる。

## 【0022】

また、本発明の変異 $\alpha$ -アミラーゼは、澱粉液化・糖化用組成物として用いることができ、更にグルコアミラーゼ、マルターゼ、プルラナーゼ、イソアミラーゼ、ネオプルラナーゼ、などから選ばれる1種または2種以上の酵素を配合し、変異 $\alpha$ -アミラーゼとともに澱粉に作用させることもできる。

## 【0023】

更に、本発明の変異 $\alpha$ -アミラーゼは、繊維の糊抜き剤組成物として用いることができ、プルラナーゼ、イソアミラーゼ或いはネオプルラナーゼ等の酵素を共に配合することもできる。

## 【0024】

## 【実施例】

アミラーゼ活性及びタンパク質量の測定

各酵素のアミラーゼ活性及びタンパク質量は以下に示す方法で行った。

アミラーゼ活性測定は、3, 5-ジニトロサリチル酸法(DNS法)で測定した。50 mMグリシン緩衝液(pH 10)中に可溶性澱粉を含む反応液中、50℃で15分間の反応を行った後、生成した還元糖をDNS法で定量することによ

って測定した。酵素の力価は 1 分間に  $1 \mu\text{mol}$  のグルコースに相当する還元糖を生成する酵素量を 1 単位とした。

蛋白量の測定は、牛血清アルブミンを標準として、Bio-Rad社のProtein Assay キットを用いて定量した。

#### 【 0 0 2 5 】

##### 参考例 1 アルカリ液化型アミラーゼのスクリーニング

土壌約 0.5 g を滅菌水に懸濁し、80℃で 15 分間加熱処理した。この熱処理液の上清を適当に滅菌水で希釈して、分離用寒天培地（培地 A）に塗布した。次いで、これを 30℃で 2 日間培養し、集落を形成させた。集落の周に澱粉溶解に基づく透明帯を形成するものを選出し、これをアミラーゼ生産菌として分離した。更に、分離菌を培地 B に接種し、30℃で 2 日間好氣的に振盪培養した。培養後、遠心分離した上清液について、キレート剤（EDTA）耐性能を測定し、更に最適作用 pH を測定して、本発明のアルカリ液化型アミラーゼ生産菌をスクリーニングした。

#### 【 0 0 2 6 】

上述の方法により、Bacillus sp.KSM-K38 (FERM P-16817) 株及びBacillus sp. KSM-K36 (FERM P-16816) 株を取得することができた。

#### 【 0 0 2 7 】

培地 A	トリプトン	1.5 %
	ソイトン	0.5 %
	塩化ナトリウム	0.5 %
	着色澱粉	0.5 %
	寒天	1.5 %
	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.5 %
	(pH 10)	

#### 【 0 0 2 8 】

培地 B	トリプトン	1.5 %
	ソイトン	0.5 %
	塩化ナトリウム	0.5 %

可溶性澱粉 1. 0 %

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0. 5 %

(pH 1 0)

【 0 0 2 9 】

K S M－K 3 8 株及びK S M－K 3 6 株の菌学的性質を表 1 に示す。

【 0 0 3 0 】

【表 1】

	KSM-K36株	KSM-K38株
(a)顕微鏡的観察結果	菌体の大きさは、K36株が1.0~1.2 $\mu$ m×2.4~5.4 $\mu$ m、K38株が1.0~1.2 $\mu$ m×1.8~3.8 $\mu$ mの桿菌であり、菌体の先端或いは中央に楕円形の内生孢子(1.0~1.2 $\mu$ m×1.2~1.4 $\mu$ m)を作る。周鞭毛を有し運動性がある。グラム染色は陽性。抗酸性はない。	
(b)各種培地に於ける生育状態 尚、本菌株は好アルカリ性のため以下の試験では、用いた培地に0.5%炭酸ナトリウムを添加した。 ・肉汁寒天平板培養  ・肉汁寒天斜面培養 ・肉汁液体培養 ・肉汁ゼラチン穿刺培養  ・リトマスミルク培地	生育状態は良い。集落の形状は円形である。表面は平滑、周縁は粗である。又、集落の色調は淡黄土色である。 生育する。 生育する。 生育状態は良い。ゼラチンの液化は認められない。 変化しない。	生育状態は良い。集落の形状は円形である。表面は平滑、周縁はスムーズである。又、集落の色調は黄褐色である。 生育する。 生育する。 生育状態は良い。ゼラチンの液化は認められない。 変化しない。
(c)生理学的性質 ・硝酸塩の還元及び脱窒反応  ・MRテスト  ・V-Pテスト ・インドールの生成 ・硫化水素の生成 ・澱粉の加水分解 ・クエン酸の利用  ・無機窒素源の利用  ・色素の生成 ・ウレアーゼ ・オキシダーゼ ・カタラーゼ ・生育の範囲  ・酸素に対する態度 ・O-Fテスト ・糖の利用性  ・食塩含有培地に於ける生育	硝酸塩の還元は陽性。 脱窒反応は陰性。 培地がアルカリ性の為、判定できず。 陰性。 陰性。 陰性。 陽性。 クリステンセン培地で生育し、コーサー培地及びシモンズ培地では生育しない。 硝酸塩は利用するが、アンモニウム塩は利用しない。 キングB培地で淡黄色の色素を生成。 陰性。 陰性。 陰性。 生育の温度範囲は、15~40℃、生育最適温度範囲は30~37℃である。 生育のpH範囲は、pH8.0~11.0、生育最適pHはpH10.0~11.0である。 好氣的。 生育せず。 D-ガラクトース、D-キシロース、L-アラビノース、ラクトース、グリセリン、メリビオース、リボース、D-グルコース、D-マンノース、マルトース、シュークロース、トレハロース、D-マンニット、澱粉、ラフィノース及びD-フラクトースを利用する。 食塩濃度が12%では生育するが、15%では生育できない。	硝酸塩の還元は陽性。 脱窒反応は陰性。 培地がアルカリ性の為、判定できず。 陰性。 陰性。 陰性。 陽性。 クリステンセン培地で生育し、コーサー培地及びシモンズ培地では生育しない。 硝酸塩は利用するが、アンモニウム塩は利用しない。 陰性。 陰性。 陰性。 陽性。 生育の温度範囲は、15~40℃、生育最適温度は30℃である。 生育のpH範囲は、pH9.0~11.0、生育最適pHは同様である。 好氣的。 生育せず。 D-ガラクトース、D-キシロース、L-アラビノース、ラクトース、グリセリン、メリビオース、リボース、D-グルコース、D-マンノース、マルトース、シュークロース、トレハロース、D-マンニット、澱粉、ラフィノース及びD-フラクトースを利用する。 食塩濃度が12%では生育するが、15%では生育できない。

【0031】

参考例 2 KSM-K38株及びKSM-K36株の培養

参考例 1 の液体培地 B に、K S M - K 3 8 株あるいは K S M - K 3 6 株を接種し、3 0 ℃ で 2 日間好氣的に振盪培養した。遠心分離上清についてアミラーゼ活性 (p H 8 . 5 ) を測定した結果、培養液 1 L 当たり、それぞれ 5 5 7 U 及び 1 7 7 U の活性を有していた。

【 0 0 3 2 】

参考例 3 アルカリ液化型アミラーゼの精製

参考例 2 で得られた K S M - K 3 8 株の培養上清液に 8 0 % 飽和濃度になるように硫酸アンモニウムを加えて攪拌後、生成した沈殿を回収し、2 m M C a C l <sub>2</sub> を含む 1 0 m M トリス塩酸緩衝液 (p H 7 . 5 ) に溶解し、同緩衝液に対して一晩透析した。得られた透析内液を同緩衝液で平衡化した D E A E - トヨパール 6 5 0 M カラムに添着し、同緩衝液を用いて 0 - 1 M の食塩の濃度勾配によりタンパクを溶出した。活性画分を同緩衝液にて透析後、ゲル濾過カラムクロマトグラフィーにより得た活性画分を上記緩衝液にて透析することによってポリアクリルアミドゲル電気泳動 (ゲル濃度 1 0 % ) 及びソディウムドデシル硫酸 (S D S ) 電気泳動で単一のバンドを与える精製酵素を得ることができた。尚、K S M - K 3 6 株の培養上清液からも同様の方法で精製酵素を得ることができた。

【 0 0 3 3 】

参考例 4 酵素特性

両精製酵素の特性は以下の通りである。

( 1 ) 作用

いずれも、澱粉、アミロース、アミロペクチン及びそれらの部分分解物の  $\alpha$  - 1 , 4 グルコシド結合を分解し、アミロースからはグルコース ( G 1 ) 、マルトース ( G 2 ) 、マルトトリオース ( G 3 ) 、マルトテトラオース ( G 4 ) 、マルトペンタオース ( G 5 ) 、マルトヘキサオース ( G 6 ) 及びマルトヘプタオース ( G 7 ) を生成する。ただしプルランには作用しない。

( 2 ) p H 安定性 ( ブリットン - ロビンソン緩衝液 )

いずれも、4 0 ℃ 、3 0 分間処理条件下で、p H 6 . 5 ~ 1 1 . 0 の範囲で 7 0 % 以上の残存活性を示す。

( 3 ) 作用温度範囲及び最適作用温度



いずれも、20～80℃の広範囲で作用し、最適作用温度は50～60℃である。

#### (4) 温度安定性

50 mMグリシン水酸化ナトリウム緩衝液 (pH 10) 中にて温度を変化させ、各温度で30分間処理することにより失活の条件を調べると、いずれも40℃で80%以上の残存活性を示し、45℃でも約60%の残存活性を示した。

#### (5) 分子量

いずれも、ソディウムドデシル硫酸ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により測定した分子量は55,000±5,000である。

#### (6) 等電点

いずれも、等電点電気泳動法により測定した等電点は4.2付近である。

#### (7) 界面活性剤の影響

直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム、アルキル硫酸エステルナトリウム塩、ポリオキシエチレンアルキル硫酸エステルナトリウム塩、 $\alpha$ -オレフィンスルホン酸ナトリウム、 $\alpha$ -スルホン化脂肪酸エステルナトリウム、アルキルスルホン酸ナトリウム、SDS、石鹼及びソフタノール等の各種界面活性剤0.1%溶液中で、pH 10、30℃で30分間処理しても、いずれも殆ど活性阻害を受けない(活性残存率90%以上)。

#### (8) 金属塩の影響

各種金属塩と共存させて、pH 10、30℃で30分間処理してその影響を調べた。

K38は、1 mMの $Mn^{2+}$ により阻害され(阻害率約75%)、1 mMの $Sr^{2+}$ 及び $Cd^{2+}$ により若干阻害される(阻害率約30%)。

K36は、1 mMの $Mn^{2+}$ により阻害され(阻害率約95%)、1 mMの $Hg^{2+}$ 、 $Be^{2+}$ 及び $Cd^{2+}$ により若干阻害される(阻害率30～40%)。

【0034】

#### 実施例1 液化型 $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子のクローニング

KSM-K38株の菌体からSaitoとMiuraの方法(Biochim. Biophys. Acta, 72, 619, 1961)の方法によって抽出した染色体DNAを鋳型とし、プライマ

ーK38US（配列番号18）及びK38DH（配列番号19）を用いて、PCR反応によって配列番号1に示されるアミノ酸配列を有する液化型アルカリ $\alpha$ -アミラーゼ（以下K38AMYと記載）をコードする遺伝子断片（約1.5kb）を増幅した。これを制限酵素Sa1Iによって切断後、発現ベクターpHSP64（特開平6-217781）のSa1I-SmaI部位に挿入することによって、pHSP64に含まれるBacillus sp. KSM-64 (FERM P-10482)株のアルカリセルラーゼ遺伝子に由来する強力プロモーターの下流に、K38AMYの構造遺伝子が結合した組換えプラスミドpHSP-K38を構築した（図1）。

## 【0035】

また、同様にBacillus sp. KSM-AP1378 (FERM BP-3048)株（特開平9-336392）から抽出した染色体DNAを鋳型とし、プライマーLAUS（配列番号20）とLADH（配列番号21）を用いたPCR反応によって増幅した配列番号2に示されるアミノ酸配列を有する液化型 $\alpha$ -アミラーゼ（以下、LAMYと記載）をコードする遺伝子断片（約1.5kb）を、上記と同様に発現ベクターpHSP64のSa1I-SmaI部位に挿入することによって、組換えプラスミドpHSP-LAMYを構築した（図1）。

## 【0036】

実施例2 変異K38AMY遺伝子の調製-1

部位特異的変異には宝酒造社のSite-Directed Mutagenesis System Mutan-Super Express Kmキットを用いた。まず、実施例1で得られた組換えプラスミドpHSP-K38を鋳型とし、プライマーCLUBG（配列番号22）及びK38DH（配列番号19）を用いてPCR反応を行うことによって、KSM-64株由来の強力プロモーターの上流から液化型アルカリ $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子の下流までの約2.1kbの断片を増幅させ、これを上記キットに付属のプラスミドベクターpKF19kのSmaI部位に挿入し、変異導入用組換えプラスミドpKF19-K38を構築した（図2）。

## 【0037】

次に、配列番号6～15に示した各種の部位特異的変異導入用オリゴヌクレオチドプライマーをT4DNAキナーゼによって5'リン酸化した後、これと上記

の pKF19-K38 を用いて、キットの方法に従って変異導入反応を行い、反応産物によって大腸菌 MV1184 株（コンピテントセル MV1184、宝酒造社製）の形質転換を行った。この結果得られた形質転換体から組換えプラスミドを抽出し、塩基配列の解析を行って変異の確認を行った。

#### 【0038】

また、変異導入した遺伝子は、上記と同様にして、発現プロモーター領域と変異 K38 AMY 遺伝子部分を再度 pKF19k の SmaI 部位に挿入することにより、異なる変異を導入する際の鑄型プラスミドとなり、上記と同様の方法によって更に別の変異を導入した。

#### 【0039】

得られた各変異組換えプラスミドを鑄型とし、プライマー CLUBG（配列番号 22）と K38 DH（配列番号 19）を用いて PCR 反応を行うことによって、各変異 K38 AMY 遺伝子断片を増幅させ、これを SalI によって切断した後、発現ベクター pHSP64（特開平 6-217781）の SalI-SmaI 部位に挿入して、変異 K38 AMY 生産用プラスミドを構築した（図 1）。

#### 【0040】

#### 実施例 3 変異 K38 AMY 遺伝子の調製-2（LAMY 遺伝子とのキメラ）

K38 AMY 遺伝子の N 末領域を LAMY 遺伝子の相当する領域と置換する変異にはリコンビナント PCR 法を用いた（図 3）。まず、実施例 1 で得られた組換えプラスミド pHSP-K38 を鑄型とし、プライマー K38 DH（配列番号 19）及び LA-K38（配列番号 16）を用いて PCR 反応を行うことによって、配列番号 1 に示される K38 AMY のアミノ酸配列の Gln20 から C 末下流までの配列をコードする断片を増幅した。一方、組換えプラスミド pHSP-LAMY を鑄型とし、プライマー CLUBG（配列番号 22）と LA-K38 R（配列番号 17）を用いた PCR 反応によって、強力プロモーターの上流から、配列番号 2 の LAMY のアミノ酸配列の 21 番目の Gly までをコードする遺伝子断片を増幅させた。次に、得られた両 DNA 断片とプライマー CLUBG（配列番号 22）と K38 DH（配列番号 19）を用いた 2 回目の PCR 反応を行うことによって、末端にプライマー LA-K38（配列番号 16）及び LA-K3

8 R (配列番号 17) に由来する相補的な配列を持つ両断片が結合し、強力プロモーターの下流に LAMY の 1 番目の His から 21 番目の Gly までをコードする領域に続いて K38 AMY の Gln 20 以降 C 末までをコードする領域が結合した置換変異酵素 (LA-K38 AMY と略する) をコードする遺伝子断片 (約 2.1 kb) が増幅された。これを Sa1 I によって切断した後、発現ベクター p HSP 64 (特開平 6-217781) の Sa1 I - Sma I 部位に挿入して、変異 K38 AMY 生産用プラスミドを構築した (図 1)。

## 【0041】

実施例 4 変異液化型アルカリ  $\alpha$ -アミラーゼの生産

実施例 2 及び 3 で得られた各種変異 K38 AMY 生産用プラスミドをプロトプラスト法 (Mol. Gen. Genet., 168, 111, 1979) により枯草菌 ISW1214 株 (leuA metB5 hsdM1) に導入し、得られた組換え枯草菌を液体培地 (コーンステープリカー、8%; 肉エキス、1%; リン酸 1 カリウム、0.02%; マルトース、5%; 塩化カルシウム、5 mM; テトラサイクリン、15  $\mu$ g/mL) で 30°C で 3 日間培養した。得られた培養上清液を Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0) にて透析し、同緩衝液にて平衡化した DEAE-トヨパール 650 M カラムに吸着させ、塩化ナトリウムの濃度勾配で溶出させた。この溶出液を 10 mM グリシン緩衝液 (pH 10.0) にて透析することにより、各変異 K38 AMY の精製酵素を得た。

## 【0042】

## 実施例 5 耐熱性の検定 - 1

実施例 1、2、4 に記載の方法により、配列番号 1 における 11 番目の Tyr を Phe に置換した酵素 (Y11F と略する)、49 番目の Asn を Ser に置換した酵素 (N49S と略する)、84 番目の Gln を Glu に置換した酵素 (E84Q と略する)、144 番目の Ser を Pro に置換した酵素 (S144P と略する)、167 番目の Gln を Glu に置換した酵素 (Q167E と略する)、169 番目の Tyr を Lys に置換した酵素 (Y169K と略する)、178 番目の Ala を Gln に置換した酵素 (A178Q と略する)、188 番目の Glu を Asp に置換した酵素 (E188D と略する)、190 番目の Asn を

Pheに置換した酵素(N190Fと略する)、及び209番目のGlnをValに置換した酵素(Q209Vと略する)の精製標品を取得し、次に示す手法で耐熱性を検定した。対照として野生型K38AMYを用いた。

あらかじめ50mMグリシン緩衝液(pH10.0)を50℃にてプレインキュベートした中に、約1.2U/mLとなるよう酵素を添加後、30分後にサンプリングし、上記実施例に示す方法で残存するアミラーゼ活性を測定した。それぞれのスタート時の活性を100%として相対活性を求め、アミラーゼ残存活性とした。結果を表2に示したが、野生型K38AMYでは30分後の残存活性が、15%まで減少したことに対し、いずれの変異酵素も野生型に比べて高い残存活性を示した。

【0043】

【表2】

酵 素	30分後の残存活性 (%)
野生型	15
Y11F	40
N49S	30
E84Q	25
S144P	30
Q167E	46
Y169K	63
A178Q	20
E188D	30
N190F	70
Q209V	40

【0044】

#### 実施例6 耐熱性の検定-2

実施例5に示した変異のうち、Q167E、Y169K、N190F及びQ209Vを次の様に組み合わせた変異酵素を実施例1、2、4に記載の方法により作製した。

Q167E/Y169K (QEYKと略する)

N190F/Q209V (NFQVと略する)

Q 1 6 7 E / Y 1 6 9 K / N 1 9 0 F / Q 2 0 9 V (Q E Y K / N F Q V と略する)

これらについて実施例 5 と同様の手法により耐熱性を検定した。ただし、熱処理の温度は 5 5 ℃ とし、対照として、Q 1 6 7 E、Y 1 6 9 K、N 1 9 0 F 及び Q 2 0 9 V を用いた。この結果、表 3 に示した様に、いずれの変異も、組み合わせによる耐熱性の向上が認められ、4 種類の変異を組み合わせた Q E Y K / N F Q V は 5 5 ℃ においても 3 0 分後に 8 5 % の残存活性を示した。

【 0 0 4 5 】

【表 3】

酵 素	30分後の残存活性 (%)
Q167E	7
Y169K	14
QBYK	45
N190F	20
Q209V	1
NFQV	40
QBYK/NFQV	85

【 0 0 4 6 】

#### 実施例 7 耐熱性の検定 - 3

実施例 6 に示した変異 N F Q V に、実施例 5 で示した変異のうち E 1 6 P と S 1 4 4 P を組み合わせた次の変異酵素を実施例 1、2、4 に記載の方法により作製した。

S 1 4 4 P / N F Q V (S P / N F Q V と略する)

E 1 6 P / S 1 4 4 P / N F Q V (E P S P / N F Q V と略する)

これらについて実施例 5 と同様の手法 (5 0 ℃) により耐熱性を検定した。

この結果、表 4 に示した様に、S P / N F Q V に対して E 1 6 P を組み合わせることで耐熱性の向上が認められた。

【 0 0 4 7 】

【表 4】

酵 素	30分後の残存活性 (%)
SP/NFQV	4 0
EPSP/NFQV	5 0

【 0 0 4 8 】

実施例 8 耐熱性の検定 - 4

実施例 4 に示した変異のうち Q E Y K / N F Q V に、配列番号 1 における 1 0 7 番目の M e t を L e u に置換した変異 (M 1 0 7 L と略する)、2 0 5 番目の H i s を A r g に置換した変異 (H 2 0 5 R と略する) 及び実施例 3 で示した変異のうち N 4 9 S を組み合わせた次のような変異酵素を実施例 1、2、4 に記載の方法により作製した。

M 1 0 7 L / Q E Y K / N F Q V (M L / Q E Y K / N F Q V と略する)

N 4 9 S / M 1 0 7 L / Q E Y K / N F Q V (N S M L / Q E Y K / N F Q V と略する)

N 4 9 S / M 1 0 7 L / H 2 0 5 R / Q E Y K / N F Q V (N S M L H R / Q E Y K / N F Q V と略する)

これらについて実施例 5 と同様の手法により耐熱性を検定した。ただし、熱処理の温度は 6 0 ℃ とした。

この結果、M L / Q E Y K / N F Q V に N 4 9 S、更には H 2 0 5 R を組み合わせることによって耐熱性は相加的に向上し、N S M L H R / Q E Y K / N F Q V は 6 0 ℃ においても 3 0 分後に 7 5 % の残存活性を示した (表 5)。

【 0 0 4 9 】

【表 5】

酵 素	30分後の残存活性 (%)
ML/QBYK/NFQV	3 0
NSML/QBYK/NFQV	5 0
NSMLHR/QBYK/NFQV	7 5

【0050】

実施例 9 耐熱性の検定-5

実施例 1、3、4 に示した方法によって、K38AMY の Asp1 から 19 番目の Gly までの配列が LAMY の 1 番目の His から 21 番目の Gly までの配列と置換した変異酵素 LA-K38AMY を取得した。この酵素の耐熱性を実施例 5 の方法によって検定した結果、表 6 に示した様に、置換による耐熱性の向上が認められた。

【0051】

【表 6】

酵 素	30分後の残存活性 (%)
野性型	15
LA/K38AMY	33

【0052】

実施例 10 耐熱性の検定-6

実施例 6 に示した変異酵素 QEYK/NFQV の遺伝子について、実施例 1 及び 3 と同様の方法により、1 番目の Asp から 19 番目の Gly までの配列が LAMY の 1 番目の His から 21 番目の Gly までの配列と置換する変異を導入した。この遺伝子を用いて実施例 4 の方法により得られた変異酵素 LA-K38AMY/QEYK/NFQV について実施例 8 と同様の手法により耐熱性を検定した（熱処理は 60℃）。

この結果、組み合わせによって耐熱性は相加的に向上し、LA-K38AMY/QEYK/NFQV は 60℃ に於いても 30 分後に 75% の残存活性を示した（表 7）。

【0053】



【表 7】

酵 素	30分後の残存活性 (%)
LA/K38AMY	1
QBYK/NFQV	4 0
LA-K38AMY/QBYK/NFQV	6 3

【 0 0 5 4 】

## 実施例 1 1 自動食器洗浄機用洗浄剤組成物

表 8 に示す配合で自動食器洗浄機用洗浄剤組成物を製造し、本洗浄剤に各変異酵素を配合して洗浄試験を行った。この結果、同一活性値の酵素を添加した場合、変異酵素は野生型酵素と比較して優れた洗浄効果を示した。

【 0 0 5 5 】

【表 8】

洗 剤 組 成	(%)
ブルロニック L-61	2. 2
炭酸ナトリウム	2 4. 7
炭酸水素ナトリウム	2 4. 7
過炭酸ナトリウム	1 0. 0
1 号珪酸ナトリウム	1 2. 0
クエン酸 3 ナトリウム	2 0. 0
ポリプロピレングリコール	2. 2
シリコン KST-04 (東芝シリコン社製)	0. 2
ソカラン CP-A45 (BASF 社製)	4. 0

【 0 0 5 6 】

## 【発明の効果】

本発明の変異  $\alpha$ -アミラーゼは、高いキレート剤耐性の優れた特性及びアルカリ領域における高い比活性を有し、更に熱に対する優れた安定性を有する。従って、自動食器洗浄機用洗浄剤、衣料用洗浄剤、澱粉液化、糖化用組成物、繊維糊抜き剤として有用である。

【 0 0 5 7 】

## 【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110>KAO CORPORATION

<120>New mutant alpha-amylase

<130>P02341106

<160>22

<210>1

<211>480

<212>PRT

<213>Bacillus sp. KSM-K38

<400>1

Asp Gly Leu Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Tyr Glu Trp His Leu Glu

5

10

15

Asn Asp Gly Gln His Trp Asn Arg Leu His Asp Asp Ala Ala Ala Leu

20

25

30

Ser Asp Ala Gly Ile Thr Ala Ile Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly

35

40

45

Asn Ser Gln Ala Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu

50

55

60

Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys

65

70

75

80

Ala Gln Leu Glu Arg Ala Ile Gly Ser Leu Lys Ser Asn Asp Ile Asn

85

90

95

Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Met Gly Ala Asp Phe Thr

100

105

110

Glu Ala Val Gln Ala Val Gln Val Asn Pro Thr Asn Arg Trp Gln Asp

115

120

125

Ile Ser Gly Ala Tyr Thr Ile Asp Ala Trp Thr Gly Phe Asp Phe Ser

130

135

140

Gly Arg Asn Asn Ala Tyr Ser Asp Phe Lys Trp Arg Trp Phe His Phe

145	150	155	160
Asn Gly Val Asp Trp Asp Gln Arg Tyr Gln Glu Asn His Ile Phe Arg			
	165	170	175
Phe Ala Asn Thr Asn Trp Asn Trp Arg Val Asp Glu Glu Asn Gly Asn			
	180	185	190
Tyr Asp Tyr Leu Leu Gly Ser Asn Ile Asp Phe Ser His Pro Glu Val			
	195	200	205
Gln Asp Glu Leu Lys Asp Trp Gly Ser Trp Phe Thr Asp Glu Leu Asp			
	210	215	220
Leu Asp Gly Tyr Arg Leu Asp Ala Ile Lys His Ile Pro Phe Trp Tyr			
225	230	235	240
Thr Ser Asp Trp Val Arg His Gln Arg Asn Glu Ala Asp Gln Asp Leu			
	245	250	255
Phe Val Val Gly Glu Tyr Trp Lys Asp Asp Val Gly Ala Leu Glu Phe			
	260	265	270
Tyr Leu Asp Glu Met Asn Trp Glu Met Ser Leu Phe Asp Val Pro Leu			
	275	280	285
Asn Tyr Asn Phe Tyr Arg Ala Ser Gln Gln Gly Gly Ser Tyr Asp Met			
	290	295	300
Arg Asn Ile Leu Arg Gly Ser Leu Val Glu Ala His Pro Met His Ala			
305	310	315	320
Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Glu Ser Leu Glu			
	325	330	335
Ser Trp Val Ala Asp Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Thr Ile Leu			
	340	345	350
Thr Arg Glu Gly Gly Tyr Pro Asn Val Phe Tyr Gly Asp Tyr Tyr Gly			
	355	360	365
Ile Pro Asn Asp Asn Ile Ser Ala Lys Lys Asp Met Ile Asp Glu Leu			
	370	375	380

Leu Asp Ala Arg Gln Asn Tyr Ala Tyr Gly Thr Gln His Asp Tyr Phe  
 385                      390                      395                      400  
 Asp His Trp Asp Val Val Gly Trp Thr Arg Glu Gly Ser Ser Ser Arg  
                     405                      410                      415  
 Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asn Gly Pro Gly Gly Ser  
                     420                      425                      430  
 Lys Trp Met Tyr Val Gly Arg Gln Asn Ala Gly Gln Thr Trp Thr Asp  
                     435                      440                      445  
 Leu Thr Gly Asn Asn Gly Ala Ser Val Thr Ile Asn Gly Asp Gly Trp  
                     450                      455                      460  
 Gly Glu Phe Phe Thr Asn Gly Gly Ser Val Ser Val Tyr Val Asn Gln  
 465                      470                      475                      480

【 0 0 5 8 】

<210>2

<211>485

<212>PRT

<213>Bacillus sp. KSM-AP1378

<400>2

His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp His  
                     5                      10                      15  
 Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Arg Asp Asp Ala Ala  
                     20                      25                      30  
 Asn Leu Lys Ser Lys Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Trp  
                     35                      40                      45  
 Lys Gly Thr Ser Gln Asn Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr  
                     50                      55                      60  
 Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly  
 65                      70                      75                      80

Thr Arg Ser Gln Leu Gln Gly Ala Val Thr Ser Leu Lys Asn Asn Gly			
	85	90	95
Ile Gln Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Gly Gly Ala Asp			
	100	105	110
Gly Thr Glu Met Val Asn Ala Val Glu Val Asn Arg Ser Asn Arg Asn			
	115	120	125
Gln Glu Ile Ser Gly Glu Tyr Thr Ile Glu Ala Trp Thr Lys Phe Asp			
	130	135	140
Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr His Ser Asn Phe Lys Trp Arg Trp Tyr			
	145	150	155
His Phe Asp Gly Thr Asp Trp Asp Gln Ser Arg Gln Leu Gln Asn Lys			
	165	170	175
Ile Tyr Lys Phe Arg Gly Thr Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp			
	180	185	190
Ile Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Ile Asp Met			
	195	200	205
Asp His Pro Glu Val Ile Asn Glu Leu Arg Asn Trp Gly Val Trp Tyr			
	210	215	220
Thr Asn Thr Leu Asn Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Val Lys His			
	225	230	235
Ile Lys Tyr Ser Tyr Thr Arg Asp Trp Leu Thr His Val Arg Asn Thr			
	245	250	255
Thr Gly Lys Pro Met Phe Ala Val Ala Glu Phe Trp Lys Asn Asp Leu			
	260	265	270
Ala Ala Ile Glu Asn Tyr Leu Asn Lys Thr Ser Trp Asn His Ser Val			
	275	280	285
Phe Asp Val Pro Leu His Tyr Asn Leu Tyr Asn Ala Ser Asn Ser Gly			
	290	295	300
Gly Tyr Phe Asp Met Arg Asn Ile Leu Asn Gly Ser Val Val Gln Lys			

305	310	315	320
His Pro Ile His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln Pro			
325	330	335	
Gly Glu Ala Leu Glu Ser Phe Val Gln Ser Trp Phe Lys Pro Leu Ala			
340	345	350	
Tyr Ala Leu Ile Leu Thr Arg Glu Gln Gly Tyr Pro Ser Val Phe Tyr			
355	360	365	
Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Thr His Gly Val Pro Ser Met Lys Ser			
370	375	380	
Lys Ile Asp Pro Leu Leu Gln Ala Arg Gln Thr Tyr Ala Tyr Gly Thr			
385	390	395	400
Gln His Asp Tyr Phe Asp His His Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu			
405	410	415	
Gly Asp Ser Ser His Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asp			
420	425	430	
Gly Pro Gly Gly Asn Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys His Lys Ala Gly			
435	440	445	
Gln Val Trp Arg Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Gly Thr Val Thr Ile			
450	455	460	
Asn Ala Asp Gly Trp Gly Asn Phe Thr Val Asn Gly Gly Ala Val Ser			
465	470	475	480
Val Trp Val Lys Gln			
485			

【 0 0 5 9 】

<210>3

<211>1753

<212>DNA

<213>Bacillus sp. KSM-K38

<400>3

gtatgcgaaa cgatgcgcaa aactgcgcaa ctactagcac tcttcaggga ctaaaccacc	60
ttttttccaa aaatgacatc atataaaciaa atttgtctac caatcactat ttaaagctgt	120
ttatgatata tgtaagcggtt atcattaaaa ggaggtatatt g atg aga aga tgg gta	176
Met Arg Arg Trp Val	
-20	
gta gca atg ttg gca gtg tta ttt tta ttt cct tcg gta gta gtt gca	224
Val Ala Met Leu Ala Val Leu Phe Leu Phe Pro Ser Val Val Val Ala	
-15 -10 -5	
gat gga ttg aac ggt acg atg atg cag tat tat gag tgg cat ttg gaa	272
Asp Gly Leu Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Tyr Glu Trp His Leu Glu	
5 10 15	
aac gac ggg cag cat tgg aat cgg ttg cac gat gat gcc gca gct ttg	320
Asn Asp Gly Gln His Trp Asn Arg Leu His Asp Asp Ala Ala Ala Leu	
20 25 30	
agt gat gct ggt att aca gct att tgg att ccg cca gcc tac aaa ggt	368
Ser Asp Ala Gly Ile Thr Ala Ile Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly	
35 40 45	
aat agt cag gcg gat gtt ggg tac ggt gca tac gat ctt tat gat tta	416
Asn Ser Gln Ala Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu	
50 55 60	
gga gag ttc aat caa aag ggt act gtt cga acg aaa tac gga act aag	464
Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys	
65 70 75 80	
gca cag ctt gaa cga gct att ggg tcc ctt aaa tct aat gat atc aat	512
Ala Gln Leu Glu Arg Ala Ile Gly Ser Leu Lys Ser Asn Asp Ile Asn	
85 90 95	
gta tac gga gat gtc gtg atg aat cat aaa atg gga gct gat ttt acg	560
Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Met Gly Ala Asp Phe Thr	
100 105 110	

gag gca gtg caa gct gtt caa gta aat cca acg aat cgt tgg cag gat	608
Glu Ala Val Gln Ala Val Gln Val Asn Pro Thr Asn Arg Trp Gln Asp	
115 120 125	
att tca ggt gcc tac acg att gat gcg tgg acg ggt ttc gac ttt tca	656
Ile Ser Gly Ala Tyr Thr Ile Asp Ala Trp Thr Gly Phe Asp Phe Ser	
130 135 140	
ggg cgt aac aac gcc tat tca gat ttt aag tgg aga tgg ttc cat ttt	704
Gly Arg Asn Asn Ala Tyr Ser Asp Phe Lys Trp Arg Trp Phe His Phe	
145 150 155 160	
aat ggt gtt gac tgg gat cag cgc tat caa gaa aat cat att ttc cgc	752
Asn Gly Val Asp Trp Asp Gln Arg Tyr Gln Glu Asn His Ile Phe Arg	
165 170 175	
ttt gca aat acg aac tgg aac tgg cga gtg gat gaa gag aac ggt aat	800
Phe Ala Asn Thr Asn Trp Asn Trp Arg Val Asp Glu Glu Asn Gly Asn	
180 185 190	
tat gat tac ctg tta gga tcg aat atc gac ttt agt cat cca gaa gta	848
Tyr Asp Tyr Leu Leu Gly Ser Asn Ile Asp Phe Ser His Pro Glu Val	
195 200 205	
caa gat gag ttg aag gat tgg ggt agc tgg ttt acc gat gag tta gat	896
Gln Asp Glu Leu Lys Asp Trp Gly Ser Trp Phe Thr Asp Glu Leu Asp	
210 215 220	
ttg gat ggt tat cgt tta gat gct att aaa cat att cca ttc tgg tat	944
Leu Asp Gly Tyr Arg Leu Asp Ala Ile Lys His Ile Pro Phe Trp Tyr	
225 230 235 240	
aca tct gat tgg gtt cgg cat cag cgc aac gaa gca gat caa gat tta	992
Thr Ser Asp Trp Val Arg His Gln Arg Asn Glu Ala Asp Gln Asp Leu	
245 250 255	
ttt gtc gta ggg gaa tat tgg aag gat gac gta ggt gct ctc gaa ttt	1040
Phe Val Val Gly Glu Tyr Trp Lys Asp Asp Val Gly Ala Leu Glu Phe	



260	265	270	
tat tta gat gaa atg aat tgg gag atg tct cta ttc gat gtt cca ctt			1088
Tyr Leu Asp Glu Met Asn Trp Glu Met Ser Leu Phe Asp Val Pro Leu			
275	280	285	
aat tat aat ttt tac cgg gct tca caa caa ggt gga agc tat gat atg			1136
Asn Tyr Asn Phe Tyr Arg Ala Ser Gln Gln Gly Gly Ser Tyr Asp Met			
290	295	300	
cgt aat att tta cga gga tct tta gta gaa gcg cat ccg atg cat gca			1184
Arg Asn Ile Leu Arg Gly Ser Leu Val Glu Ala His Pro Met His Ala			
305	310	315	320
gtt acg ttt gtt gat aat cat gat act cag cca ggg gag tca tta gag			1232
Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Glu Ser Leu Glu			
325	330	335	
tca tgg gtt gct gat tgg ttt aag cca ctt gct tat gcg aca att ttg			1280
Ser Trp Val Ala Asp Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Thr Ile Leu			
340	345	350	
acg cgt gaa ggt ggt tat cca aat gta ttt tac ggt gat tac tat ggg			1328
Thr Arg Glu Gly Gly Tyr Pro Asn Val Phe Tyr Gly Asp Tyr Tyr Gly			
355	360	365	
att cct aac gat aac att tca gct aaa aaa gat atg att gat gag ctg			1376
Ile Pro Asn Asp Asn Ile Ser Ala Lys Lys Asp Met Ile Asp Glu Leu			
370	375	380	
ctt gat gca cgt caa aat tac gca tat ggc acg cag cat gac tat ttt			1424
Leu Asp Ala Arg Gln Asn Tyr Ala Tyr Gly Thr Gln His Asp Tyr Phe			
385	390	395	400
gat cat tgg gat gtt gta gga tgg act agg gaa gga tct tcc tcc aga			1472
Asp His Trp Asp Val Val Gly Trp Thr Arg Glu Gly Ser Ser Ser Arg			
405	410	415	

cct aat tca ggc ctt gcg act att atg tcg aat gga cct ggt ggt tcc 1520  
 Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asn Gly Pro Gly Gly Ser  
 420 425 430  
 aag tgg atg tat gta gga cgt cag aat gca gga caa aca tgg aca gat 1568  
 Lys Trp Met Tyr Val Gly Arg Gln Asn Ala Gly Gln Thr Trp Thr Asp  
 435 440 445  
 tta act ggt aat aac gga gcg tcc gtt aca att aat ggc gat gga tgg 1616  
 Leu Thr Gly Asn Asn Gly Ala Ser Val Thr Ile Asn Gly Asp Gly Trp  
 450 455 460  
 ggc gaa ttc ttt acg aat gga gga tct gta tcc gtg tac gtg aac caa 1664  
 Gly Glu Phe Phe Thr Asn Gly Gly Ser Val Ser Val Tyr Val Asn Gln  
 465 470 475 480  
 taacaaaaag ccttgagaag ggattcctcc ctaactcaag gctttcttta tgtcgttag 1724  
 cttaacgctt ctacgacttt gaagcttta 1753

【 0 0 6 0 】

<210>4

<211>480

<212>PRT

<213>Bacillus sp. KSM-K36

<400>4

Asp Gly Leu Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Tyr Glu Trp His Leu Glu  
 5 10 15  
 Asn Asp Gly Gln His Trp Asn Arg Leu His Asp Asp Ala Glu Ala Leu  
 20 25 30  
 Ser Asn Ala Gly Ile Thr Ala Ile Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly  
 35 40 45  
 Asn Ser Gln Ala Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu  
 50 55 60  
 Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys

65	70	75	80
Ala Gln Leu Glu Arg	Ala Ile Gly Ser	Leu Lys Ser Asn	Asp Ile Asn
85	90	95	
Val Tyr Gly Asp Val	Val Met Asn His	Lys Leu Gly Ala	Asp Phe Thr
100	105	110	
Glu Ala Val Gln Ala	Val Gln Val Asn	Pro Ser Asn Arg	Trp Gln Asp
115	120	125	
Ile Ser Gly Val Tyr	Thr Ile Asp Ala	Trp Thr Gly Phe	Asp Phe Pro
130	135	140	
Gly Arg Asn Asn Ala	Tyr Ser Asp Phe	Lys Trp Arg Trp	Phe His Phe
145	150	155	160
Asn Gly Val Asp Trp	Asp Gln Arg Tyr	Gln Glu Asn His	Leu Phe Arg
165	170	175	
Phe Ala Asn Thr Asn	Trp Asn Trp Arg	Val Asp Glu Glu	Asn Gly Asn
180	185	190	
Tyr Asp Tyr Leu Leu	Gly Ser Asn Ile	Asp Phe Ser His	Pro Glu Val
195	200	205	
Gln Glu Glu Leu Lys	Asp Trp Gly Ser	Trp Phe Thr Asp	Glu Leu Asp
210	215	220	
Leu Asp Gly Tyr Arg	Leu Asp Ala Ile	Lys His Ile Pro	Phe Trp Tyr
225	230	235	240
Thr Ser Asp Trp Val	Arg His Gln Arg	Ser Glu Ala Asp	Gln Asp Leu
245	250	255	
Phe Val Val Gly Glu	Tyr Trp Lys Asp	Asp Val Gly Ala	Leu Glu Phe
260	265	270	
Tyr Leu Asp Glu Met	Asn Trp Glu Met	Ser Leu Phe Asp	Val Pro Leu
275	280	285	
Asn Tyr Asn Phe Tyr	Arg Ala Ser Lys	Gln Gly Gly Ser	Tyr Asp Met
290	295	300	

Arg Asn Ile Leu Arg Gly Ser Leu Val Glu Ala His Pro Ile His Ala  
 305 310 315 320  
 Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Glu Ser Leu Glu  
 325 330 335  
 Ser Trp Val Ala Asp Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Thr Ile Leu  
 340 345 350  
 Thr Arg Glu Gly Gly Tyr Pro Asn Val Phe Tyr Gly Asp Tyr Tyr Gly  
 355 360 365  
 Ile Pro Asn Asp Asn Ile Ser Ala Lys Lys Asp Met Ile Asp Glu Leu  
 370 375 380  
 Leu Asp Ala Arg Gln Asn Tyr Ala Tyr Gly Thr Gln His Asp Tyr Phe  
 385 390 395 400  
 Asp His Trp Asp Ile Val Gly Trp Thr Arg Glu Gly Thr Ser Ser Arg  
 405 410 415  
 Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asn Gly Pro Gly Gly Ser  
 420 425 430  
 Lys Trp Met Tyr Val Gly Gln Gln His Ala Gly Gln Thr Trp Thr Asp  
 435 440 445  
 Leu Thr Gly Asn His Ala Ala Ser Val Thr Ile Asn Gly Asp Gly Trp  
 450 455 460  
 Gly Glu Phe Phe Thr Asn Gly Gly Ser Val Ser Val Tyr Val Asn Gln  
 465 470 475 480

【0 0 6 1】

<210>5

<211>1625

<212>DNA

<213>Bacillus sp.KSM-K36

<400>5

atgatatatg taagcgttat cattaaaagg aggtatttg atg aaa aga tgg gta

54

Met Lys Arg Trp Val

-20

gta gca atg ctg gca gtg tta ttt tta ttt cct tcg gta gta gtt gca 102

Val Ala Met Leu Ala Val Leu Phe Leu Phe Pro Ser Val Val Val Ala

-15

-10

-5

gat ggc ttg aat gga acg atg atg cag tat tat gag tgg cat cta gag 150

Asp Gly Leu Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Tyr Glu Trp His Leu Glu

5

10

15

aat gat ggg caa cac tgg aat cgg ttg cat gat gat gcc gaa gct tta 198

Asn Asp Gly Gln His Trp Asn Arg Leu His Asp Asp Ala Glu Ala Leu

20

25

30

agt aat gcg ggt att aca gct att tgg ata ccc cca gcc tac aaa gga 246

Ser Asn Ala Gly Ile Thr Ala Ile Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly

35

40

45

aat agt cag gct gat gtt ggg tat ggt gca tac gac ctt tat gat tta 294

Asn Ser Gln Ala Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu

50

55

60

ggg gag ttt aat caa aaa ggt acc gtt cga acg aaa tac ggg aca aag 342

Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys

65

70

75

80

gct cag ctt gag cga gct ata ggg tcc cta aag tcg aat gat atc aat 390

Ala Gln Leu Glu Arg Ala Ile Gly Ser Leu Lys Ser Asn Asp Ile Asn

85

90

95

gtt tat ggg gat gtc gta atg aat cat aaa tta gga gct gat ttc acg 438

Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Leu Gly Ala Asp Phe Thr

100

105

110

gag gca gtg caa gct gtt caa gta aat cct tcg aac cgt tgg cag gat 486

Glu Ala Val Gln Ala Val Gln Val Asn Pro Ser Asn Arg Trp Gln Asp

115

120

125

att tca ggt gtc tac acg att gat gca tgg acg gga ttt gac ttt cca	534
Ile Ser Gly Val Tyr Thr Ile Asp Ala Trp Thr Gly Phe Asp Phe Pro	
130 135 140	
ggg cgc aac aat gcc tat tcc gat ttt aaa tgg aga tgg ttc cat ttt	582
Gly Arg Asn Asn Ala Tyr Ser Asp Phe Lys Trp Arg Trp Phe His Phe	
145 150 155 160	
aat ggc gtt gac tgg gat caa cgc tat caa gaa aac cat ctt ttt cgc	630
Asn Gly Val Asp Trp Asp Gln Arg Tyr Gln Glu Asn His Leu Phe Arg	
165 170 175	
ttt gca aat acg aac tgg aac tgg cga gtg gat gaa gag aat ggt aat	678
Phe Ala Asn Thr Asn Trp Asn Trp Arg Val Asp Glu Glu Asn Gly Asn	
180 185 190	
tat gac tat tta tta gga tcg aac att gac ttt agc cac cca gag gtt	726
Tyr Asp Tyr Leu Leu Gly Ser Asn Ile Asp Phe Ser His Pro Glu Val	
195 200 205	
caa gag gaa tta aag gat tgg ggg agc tgg ttt acg gat gag cta gat	774
Gln Glu Glu Leu Lys Asp Trp Gly Ser Trp Phe Thr Asp Glu Leu Asp	
210 215 220	
tta gat ggg tat cga ttg gat gct att aag cat att cca ttc tgg tat	822
Leu Asp Gly Tyr Arg Leu Asp Ala Ile Lys His Ile Pro Phe Trp Tyr	
225 230 235 240	
acg tca gat tgg gtt agg cat cag cga agt gaa gca gac caa gat tta	870
Thr Ser Asp Trp Val Arg His Gln Arg Ser Glu Ala Asp Gln Asp Leu	
245 250 255	
ttt gtc gta ggg gag tat tgg aag gat gac gta ggt gct ctc gaa ttt	918
Phe Val Val Gly Glu Tyr Trp Lys Asp Asp Val Gly Ala Leu Glu Phe	
260 265 270	
tat tta gat gaa atg aat tgg gag atg tct cta ttc gat gtt ccg ctc	966
Tyr Leu Asp Glu Met Asn Trp Glu Met Ser Leu Phe Asp Val Pro Leu	

275	280	285	
aat tat aat ttt tac cgg gct tca aag caa ggc gga agc tat gat atg			1014
Asn Tyr Asn Phe Tyr Arg Ala Ser Lys Gln Gly Gly Ser Tyr Asp Met			
290	295	300	
cgt aat att tta cga gga tct tta gta gaa gca cat ccg att cat gca			1062
Arg Asn Ile Leu Arg Gly Ser Leu Val Glu Ala His Pro Ile His Ala			
305	310	315	320
gtt acg ttt gtt gat aat cat gat act cag cca gga gag tca tta gaa			1110
Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Glu Ser Leu Glu			
	325	330	335
tca tgg gtc gct gat tgg ttt aag cca ctt gct tat gcg aca atc ttg			1158
Ser Trp Val Ala Asp Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Thr Ile Leu			
	340	345	350
acg cgt gaa ggt ggt tat cca aat gta ttt tac ggt gac tac tat ggg			1206
Thr Arg Glu Gly Gly Tyr Pro Asn Val Phe Tyr Gly Asp Tyr Tyr Gly			
	355	360	365
att cct aac gat aac att tca gct aag aag gat atg att gat gag ttg			1254
Ile Pro Asn Asp Asn Ile Ser Ala Lys Lys Asp Met Ile Asp Glu Leu			
	370	375	380
ctt gat gca cgt caa aat tac gca tat ggc aca caa cat gac tat ttt			1302
Leu Asp Ala Arg Gln Asn Tyr Ala Tyr Gly Thr Gln His Asp Tyr Phe			
385	390	395	400
gat cat tgg gat atc gtt gga tgg aca aga gaa ggt aca tcc tca cgt			1350
Asp His Trp Asp Ile Val Gly Trp Thr Arg Glu Gly Thr Ser Ser Arg			
	405	410	415
cct aat tcg ggt ctt gct act att atg tcc aat ggt cct gga gga tca			1398
Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asn Gly Pr Gly Gly Ser			
	420	425	430
aaa tgg atg tac gta gga cag caa cat gca gga caa acg tgg aca gat			1446

Lys Trp Met Tyr Val Gly Gln Gln His Ala Gly Gln Thr Trp Thr Asp  
 435 440 445  
 tta act ggc aat cac gcg gcg tcg gtt acg att aat ggt gat ggc tgg 1494  
 Leu Thr Gly Asn His Ala Ala Ser Val Thr Ile Asn Gly Asp Gly Trp  
 450 455 460  
 ggc gaa ttc ttt aca aat gga gga tct gta tcc gtg tat gtg aac caa 1542  
 Gly Glu Phe Phe Thr Asn Gly Gly Ser Val Ser Val Tyr Val Asn Gln  
 465 470 475 480  
 taataaaaag.ccttgagaag ggattcctcc ctaactcaag gctttcttta tgcgttttag 1602  
 ctcaacgctt ctacgaagct tta 1625

【0 0 6 2】

<210>6

<211>30

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>6

atgatgcagt attttgagtg gcatttggaa 30

【0 0 6 3】

<210>7

<211>33

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>7

tatgagtggc atttgccaaa cgacgggcag cat 33

【0 0 6 4】

<210>8

<211>33

<212>DNA

<213>Artificial Sequence



<400>8

ccagcctaca aaggtactag tcaggcggat gtt 33

【 0 0 6 5 】

<210>9

<211>21

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>9

gcacagcttc aacgagctat t 21

【 0 0 6 6 】

<210>10

<211>21

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>10

tttcgacttt ccagggcgta a 21

【 0 0 6 7 】

<210>11

<211>33

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>11

catattttcc gctttcaaaa tacgaactgg aac 33

【 0 0 6 8 】

<210>12

<211>33

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>12

aactggcgag tggatgatga gaacggtaat tat 33

【 0 0 6 9 】

<210>13

<211>25

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>13

tggatgaaga gttcggtaat tatga 25

【 0 0 7 0 】

<210>14

<211>33

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>14

aatatcgact ttagtcgtcc agaagtacaa gat 33

【 0 0 7 1 】

<210>15

<211>33

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>15

agtcacccag aggtcgtaga tgagttgaag gat 33

【 0 0 7 2 】

<210>16

<211>34

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>16

atttgccaaa tgacgggcag cattggaatc gggtt 34

【 0 0 7 3 】

<210>17

<211>34

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>17

aaccgattcc aatgctgccc gtcatttggc aaat 34

【 0 0 7 4 】

<210>18

<211>40

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>18

gggtcgacca gcacaagccg atggattgaa cggtacgatg 40

【 0 0 7 5 】

<210>19

<211>29

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>19

taaagctttt gttattggtt cacgtacac 29

【 0 0 7 6 】

<210>20

<211>30

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>20

gagtcgacca gcacaagccc atcataatgg 30

【 0 0 7 7 】

<210>21

<211>21

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>21

taaagcttca atttatattg g 21

【 0 0 7 8 】

<210>22

<211>27

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>22

ccagatctac ttaccatttt agagtca 27

【図面の簡単な説明】

【図 1】

K S M－K 3 8 株及びK S M－A P 1 3 7 8 株由来の $\alpha$ －アミラーゼ生産用組換えプラスミドの構築方法を示す図である。

【図 2】

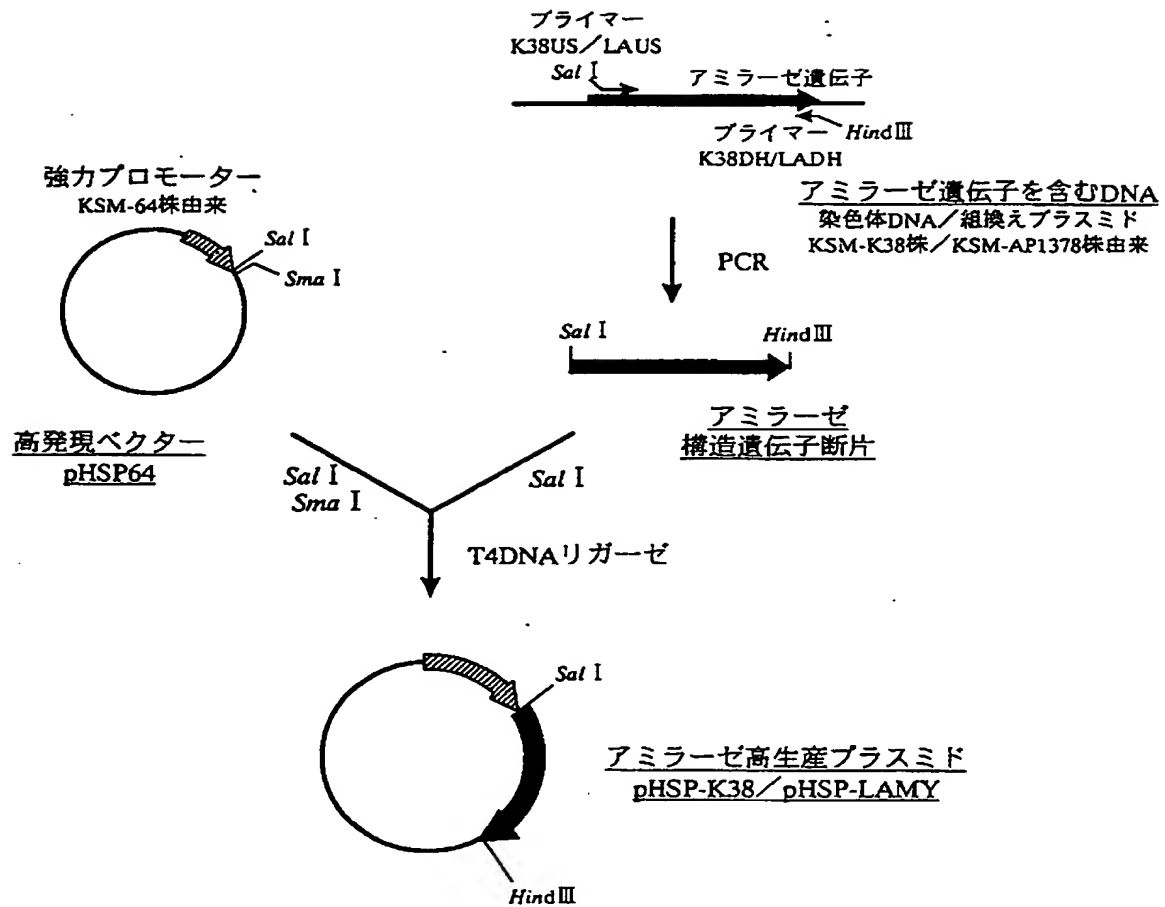
K S M－K 3 8 株由来の $\alpha$ －アミラーゼ遺伝子の変異導入方法を示す模式図である。

【図 3】

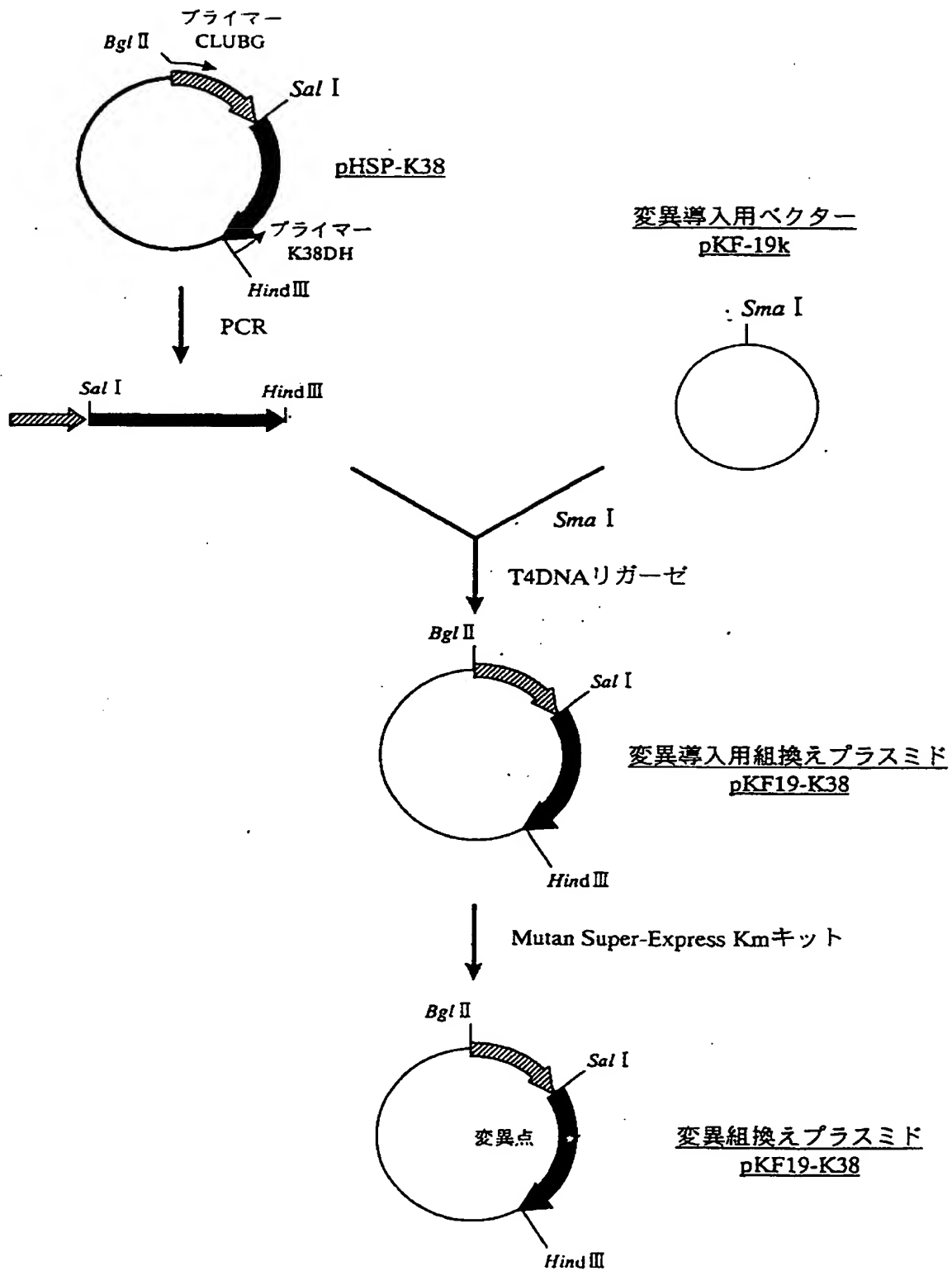
K S M－K 3 8 株由来の $\alpha$ －アミラーゼ遺伝子のN末配列をK S M－A P 1 3 7 8 株由来の $\alpha$ －アミラーゼ遺伝子のN末領域と置換する方法を示す図である。

【書類名】 図面

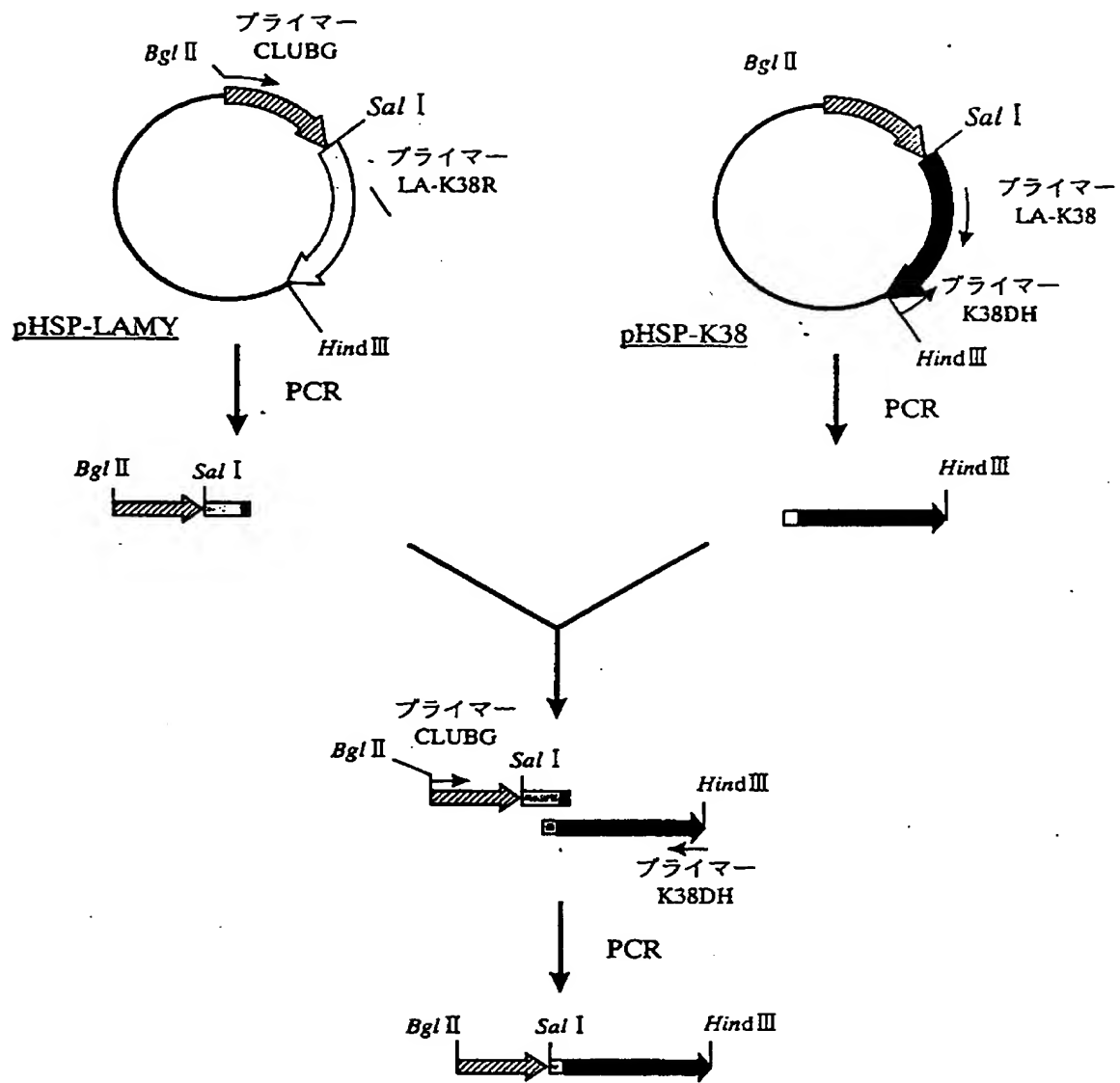
【図 1】



【図 2】



【図 3】



【書類名】 要約書

【要約】

【解決手段】 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列に対して 70% 以上の相同性を有する  $\alpha$ -アミラーゼにおいて、該アミノ酸配列の 167 番目の Gln、169 番目の Tyr、178 番目の Ala 等のアミノ酸残基の 1 残基以上を置換又は欠失させてなる変異  $\alpha$ -アミラーゼ、当該変異  $\alpha$ -アミラーゼをコードする遺伝子、ベクター、形質転換細胞、形質転換細胞を培養することを特徴とする変異  $\alpha$ -アミラーゼの製造方法、当該変異  $\alpha$ -アミラーゼを含む洗浄剤組成物。

【効果】 本発明の変異  $\alpha$ -アミラーゼは、高いキレート剤耐性の優れた特性及びアルカリ領域における高い比活性を有し、更に熱に対する優れた安定性を有することから、自動食器洗浄機用洗浄剤、衣料用洗浄剤等として有用である。

【選択図】 なし



出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000000918]

1. 変更年月日 1990年 8月24日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都中央区日本橋茅場町1丁目14番10号

氏 名 花王株式会社